

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA

Ciclo 33

**Settore Concorsuale:** 06/D3 - MALATTIE DEL SANGUE, ONCOLOGIA E REUMATOLOGIA

**Settore Scientifico Disciplinare:** MED/06 – ONCOLOGIA MEDICA

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE PER LA MEDICINA PERSONALIZZATA  
NEL PAZIENTE ONCOLOGICO

**Presentata da:** Karim Rihawi

**Coordinatore Dottorato**

Manuela Ferracin

**Supervisore**

Andrea Ardizzoni

**Esame finale anno 2021**

## **INDICE**

<b>Introduzione</b>	<b>Pag. 2</b>
<b>Obiettivi dello studio</b>	<b>Pag. 9</b>
<b>Materiali e metodi dello studio</b>	<b>Pag. 10</b>
<b>Risultati e Discussione</b>	<b>Pag. 23</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>Pag. 44</b>

## INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'allungamento dell'aspettativa di vita del paziente oncologico sembra non aver tratto benefici proporzionali ai cospicui investimenti e all'incredibile sforzo compiuto dalla ricerca oncologica per la messa a punto di tecniche diagnostiche accurate e lo sviluppo di farmaci efficaci.

La percezione della comunità scientifica è che la complessità del cancro vada ben oltre le attuali conoscenze e che sia necessario un approccio innovativo che permetta di raggiungere un profondo livello di comprensione della patologia al fine di migliorarne la diagnosi e la terapia.

Ad oggi le metastasi originate dal tumore primitivo rappresentano la maggiore causa di morte in seguito a diagnosi di tumore: infatti anche se il tumore primitivo viene rimosso mediante resezione chirurgica, cellule che da esso si sono immesse nella circolazione periferica (Circulating tumor Cells, CTCs) possono raggiungere un sito secondario, uscire dal circolo ematico e dare origine a metastasi; lo stesso dicasi della circolazione linfatica con relativo interessamento degli organi linfatici, in particolare dei linfonodi [1-6].

Uno degli argomenti più attuali circa la comprensione della capacità di metastatizzare dei tumori è la caratterizzazione a livello cellulare e soprattutto molecolare delle cellule che sono in grado di compiere la transizione dal fenotipo epiteliale a quello mesenchimale (Epithelial to Mesenchymal Transition EMT), cellule cioè che acquisiscono capacità staminali e sono in grado di dare origine alle metastasi [7-8]. Infatti è ormai scientificamente riconosciuto che il tumore è composto da una compagine di cellule non identiche, ma da sottopopolazioni di cellule fenotipicamente e geneticamente diverse. L'eterogeneità delle cellule tumorali che compongono il tumore primitivo si riflette sulle cellule tumorali circolanti e quindi sulle metastasi, e rende le cellule tumorali un

bersaglio difficile per le terapie genetiche che sono attualmente utilizzate per il trattamento di alcuni tumori [7-10].

Infatti le terapie anti-tumorali personalizzate correntemente in uso hanno come bersaglio cellule con condizioni genetiche patologiche accertate: ad esempio trastuzumab viene somministrato a pazienti con tumore mammario solo se quest'ultimo risulta positivo all'analisi per la duplicazione del gene Her2-Neu. Questo approccio, pur rappresentando un incredibile miglioramento nel trattamento delle neoplasie, limita il beneficio ai pazienti rispondenti alle caratteristiche genetiche necessarie per la somministrazione del trattamento, e circoscrive l'azione del farmaco esclusivamente alle cellule positive per quella mutazione, lasciando sostanzialmente inalterate le cellule che compongono la compagine tumorale.

Secondo i protocolli clinici la terapia personalizzata con farmaci anti tumorali viene somministrata solo in seguito all'analisi della mutazione specifica sul tessuto primitivo, ma alla luce degli ormai numerosi studi che evidenziano l'eterogeneità genetica come caratteristica fondamentale del tumore, si fa strada l'ipotesi che una diagnosi più accurata e su campioni biologici diversi potrebbe aprire le porte della terapia personalizzata anche a pazienti che con le metodiche tradizionali non sono risultati trattabili.

L'indicazione che emerge dalle attuali conoscenze in materia di genetica dei tumori è che, per sviluppare nuove terapie e/o per migliorare la specificità della casistica di pazienti che possono beneficiare delle attuali terapie personalizzate, è necessaria una caratterizzazione molecolare più specifica e più approfondita di quanto è stato fatto fino ad ora.

La letteratura scientifica ha evidenziato che l'eterogeneità genetica del tumore si evidenzia a livello di:

- sede di insorgenza del tumore primitivo (mammella, polmone, ecc)
- stessa prima sede di insorgenza in pazienti diversi (es. pazienti di tumore mammario positivi o negativi per la mutazione del gene Her2)
- stesso paziente con caratteristiche genetiche diverse nei campioni biologici (es: tumore primitivo negativo, ma metastasi positiva per Her2).
- stesso campione biologico con differenza genetiche in sub-popolazioni tumorali (es CTC) [9-13].

A livello terapeutico è evidente che farmaci che hanno come target condizioni genetiche particolari, debbano essere associati a metodi di indagine estremamente sensibili, per garantire che il trattamento non venga negato a chi può beneficiarne e somministrato a chi non risponderà alla terapia. L'accertamento diagnostico volto all'identificazione della suscettibilità ad un dato farmaco, viene oggi condotto essenzialmente sul tessuto prelevato dal tumore primitivo, in genere conservato come campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE), mentre vengono esclusi altri campioni biologici (es. sangue periferico).

Si tratta ovviamente di un grandissimo progresso per il trattamento e la cura del cancro ma i tessuti attaccati dal tumore, possono svelare molte più informazioni genetiche.

Le biopsie di tessuti primari sono frequentemente preparate come campioni FFPE. Questa procedura ha il vantaggio di produrre campioni che possono essere facilmente conservati a temperatura ambiente, permettendo l'analisi genetica anche a distanza di anni, ma ha come effetto la degradazione degli acidi nucleici la cui analisi, anche con metodi innovativi come PCR real time

e tecniche di Next Generation Sequencing (NGS), non raggiungono la sensibilità necessaria a causa della presenza delle cellule non-tumorali (cellule contaminanti) [14-15].

Il metodo più comunemente utilizzato per l'analisi di campioni FFPE è l'estrazione del DNA da fettine tagliate da blocchetti di tessuti FFPE. Mediante questa procedura la fettina di tessuto è normalmente de-paraffinata e il DNA viene estratto dalla totalità di cellule che la compongono. Il risultato è la caratterizzazione o l'analisi della totalità del DNA presente nel campione, ovvero DNA delle cellule tumorali, di quelle stromali, degli eventuali linfociti infiltranti ecc. La conseguenza della presenza di cellule non tumorali nel DNA estratto è che la valutazione di una mutazione, come frequenza di quante volte viene letta nel campione in analisi, è nella migliore delle ipotesi una stima.

Secondo l'approccio proposto in questo studio, una fettina o un punch ottenuto da un blocchetto di tessuto FFPE possono essere de-paraffinizzati e il tessuto disgregato fino all'ottenimento di una sospensione cellulare, dalla quale, grazie ad una marcatura specifica in immunofluorescenza e l'utilizzo della piattaforma DEPArray™, cellule tumorali pure possono essere isolate per un'accurata caratterizzazione genetica mediante NGS.

In questo modo si possono identificare con certezza, mutazioni presenti in sottopopolazioni di cellule tumorali la cui frequenza (*variant frequency*) è troppo bassa per poter essere rilevata dalla metodica tradizionale.

Lo stesso approccio è applicabile alle Circulating Tumor Cells (CTCs); la facile accessibilità del campione, la ripetibilità del prelievo e la possibilità di monitorare l'andamento della malattia nel paziente mediante la conta delle CTC, ha fatto sì che queste venissero considerate una sorta di

biopsia liquida, ovvero un campionamento non invasivo della massa tumorale.

Le informazioni genetiche che abbiamo oggi ci portano a considerare le CTC un campione valido non solo per la prognosi del paziente (CTC  $\geq 5/7,5$  ml di sangue sono indice di prognosi negativa per il paziente), ma soprattutto indirizzare il trattamento farmacologico.

L'innovazione introdotta da questo studio è quella di utilizzare la piattaforma DEPArray™ per isolare cellule tumorali pure (da tessuto tumorale o da sangue periferico) e ottenere una reale caratterizzazione del tumore mediante l'analisi genetica delle cellule pure, ovvero senza la presenza di cellule non tumorali che falsano il dato genetico.

Inoltre questo studio si propone di effettuare una caratterizzazione molecolare *multi livello* ovvero su diversi campioni biologici dello stesso paziente e/ stesso campione biologico prelevato a diversi stadi della patologia.

Le tecniche di Next Generation Sequencing (NGS), che pur hanno rappresentato una sensibile innovazione per l'analisi genetica applicata all'oncologia, nella maggior parte dei casi non sono in grado di restituire un'informazione completa e realmente utile alla terapia del tumore. Le tecniche di NGS si basano sul sequenziamento ad alta densità (*deep sequencing*) del DNA estratto da un campione biologico (tessuto, sangue, ecc): più è elevato il *coverage*, cioè in numero di volte in cui una determinata sequenza di DNA è sequenziata (reads), più è accurato il sequenziamento quindi il dato ottenuto dal campione. Tuttavia la natura dei campioni biologici, sebbene possano essere utilizzate tecniche di arricchimento per aumentare il rapporto tra le cellule target (tumorali) e le contaminanti, rimane quella di un campione misto la cui eterogeneità genetica non riesce ad essere risolta dalle tecniche di NGS [16-18]. Ad esempio un campione di sangue, per quanto arricchito, potrà contenere tra l'1 e il 10% di CTC: le mutazioni identificate (come *variants frequencies*)

saranno in un intervallo in percentuale molto vicino al rumore di fondo, ovvero all'errore tecnico commesso dallo strumento. Le mutazioni inoltre possono essere in omozigosi o in eterozigosi, oppure presenti solo in una sottopopolazione delle cellule target il che determina un'ulteriore diluizione del dato genetico ottenuto, e nella maggior parte dei casi l'omessa rilevazione mediante le tecniche convenzionali.

Con questo studio si intende ottenere una reale caratterizzazione delle cellule tumorali, singole o in gruppi di piccole dimensioni (esempio 300 cellule) dalle caratteristiche omogenee, quali positività o negatività ad un determinato marker tumorale, contenuto in DNA.

La caratteristica innovativa di questo studio è quella di ottenere cellule tumorali pure, grazie all'utilizzo della piattaforma DEPArray™ per l'isolamento delle cellule tumorali a partire da un campione biologico ridotto ad una sospensione cellulare [19-21].

L'intento principale del progetto è quello di creare un quadro genetico relativo ad ogni paziente, e quindi di trarne informazioni concretamente utilizzabili nella terapia farmacologica personalizzata.

La percezione dell'attuale utilizzo dei farmaci bersaglio è che questi siano utilizzati su una base di informazioni genetiche incomplete e che analisi più accurate potrebbero portare:

- un numero maggiore di pazienti a beneficiare delle terapie attualmente disponibili
- ad una somministrazione più specifica di farmaci
- all'identificazione di nuovi target genetici per l'azione di nuovi farmaci per la medicina personalizzata.

Inoltre il campionamento longitudinale di alcuni campioni biologici (es. sangue periferico) dallo stesso paziente, introduce la possibilità di effettuare un monitoraggio dell'evoluzione genetica del



tumore.

## OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo primario dello studio è la caratterizzazione dell'eterogeneità molecolare *multi livello* in pazienti oncologici, intesa come l'analisi di campioni biologici diversi dallo stesso paziente (quali ad esempio, sangue periferico, tessuto tumorale primitivo e/o metastatico e altri), eventualmente in relazione all'evoluzione temporale qualora siano disponibili campioni longitudinali. La tecnologia di base abilitante per lo studio è la piattaforma DEPArray™, che rappresenta ad oggi l'unica tecnologia in grado separare con un grado di purezza del 100% cellule tumorali dalle cellule non-tumorali, siano esse cellule del sangue o cellule stromali presenti nel tessuto neoplastico. Questo approccio garantisce la digitalizzazione del campione biologico –con risoluzione di singola cellula-, rendendo possibile l'analisi del dato molecolare senza l'alterazione comportata dalla contaminazione con cellule tumorali.

Un secondo obiettivo è confrontare, ove disponibili, i dati ottenuti con le metodologie tradizionali sulla base della quali viene presa la decisione per la somministrazione dei farmaci bersaglio, con i dati ottenuti a valle dell'isolamento delle cellule mediante DEPArray™, anche in relazione al follow-up clinico e/o alla terapia.

## MATERIALI E METODI DELLO STUDIO

- **Reclutamento dei pazienti**

I pazienti afferenti all'unità operativa di Oncologia Medica del Policlinico Sant'Orsola di Bologna sono stati valutati in base ai criteri di arruolamento dei pazienti per questo studio; a coloro che rispondevano a tutti i criteri, è stato proposto un consenso informato per l'adesione volontaria allo studio. Nello studio sono stati arruolati 190 pazienti con diagnosi (istologica e/o strumentale) di carcinoma per i quali è stato diagnosticato come sede del tumore primitivo: polmone, rene, ovaio, prostata, tratto bilio-pancreatico, melanoma e neoplasie ad origine sconosciuta.

Lo studio includeva la possibilità di analizzare campioni biologici (es. sangue periferico) raccolti longitudinalmente, ovvero in diversi stadi della patologia, nello stesso paziente.

Sono stati arruolati per questo studio pazienti che corrispondono ai criteri di eleggibilità riassunti nella Tabella 1.

		Requisito Necessario	Requisito Opzionale
1	Maggiore età	X	
2	Consenso informato accettato e firmato	X	
3	Diagnosi cito-istologica di neoplasia solida maligna	X	

4	Disponibilità di tessuto tumorale fresco, congelato o paraffinato		X
5	Presenza di stadio localmente avanzato (N+) o di malattia metastatica	X	

Tab.1 Criteri di eleggibilità dei pazienti per questo studio

Sono invece stati esclusi dall'arruolamento i pazienti che corrispondono alle caratteristiche descritte nella Tabella 2.

1	Non vogliono oppure non possono firmare il consenso informato
2	Sono positivi a malattie infette infettive quali HIV e HCV
3	Diagnosi dubbia o solo strumentale di neoplasia
4	Mancanza di accessi venosi adeguati

Tab.2 Criteri di esclusione dei pazienti per questo studio

Al momento dell'arruolamento le informazioni che sono state raccolte nelle schede raccolte dati (case report form – CRF) sono state:

- Dati demografici
- Storia medica
- Sede di malattia
- Tipo di tumore
- Precedente radioterapia
- Terapie precedenti

- Terapia medica concomitante
- Paziente arruolato in protocolli di ricerca con farmaci sperimentali e se si quale
- Esiti di precedenti analisi e accertamenti strumentali (es. esame istologico, eventuali test per farmaci bersaglio, familiarità ecc).
- **Raccolta dei campioni biologici**

## SANGUE PERIFERICO

Ai pazienti per i quali era previsto un prelievo di sangue periferico nel corso del normale iter diagnostico, è stato proposto di donare un volume massimo di 20ml per questo studio.

Il prelievo di sangue periferico dei pazienti è stato raccolto in provette di diverso tipo, contenenti EDTA oppure altri coagulanti e conservanti delle cellule quali CellSave® (Veridex) o Streck.

I campioni biologici raccolti presso il Policlinico Sant'Orsola-Malpighi sono stati quindi trasferiti presso i laboratori di Silicon Biosystems S.p.A. e processati.

- **Isolamento e analisi di cellule tumorali circolanti (CTC) da sangue periferico**

In molteplici pubblicazioni viene riconosciuta l'eterogeneità morfologica, funzionale e genetica delle CTC e la loro rilevanza diagnostica oltre a quella prognostica già nota da tempo.

Le CTC sono cellule rare rispetto alla totalità di cellule presenti nel sangue, che per questo sono dette contaminanti. Diversi metodi, con diversi gradi di automatismo, sono stati sviluppati per l'arricchimento delle CTC. Per arricchimento si intende infatti l'aumento del rapporto CTC/contaminanti a favore delle CTC. Tuttavia ad oggi nessun metodo di arricchimento riesce a superare l'ostacolo delle contaminanti ed il risultato dell'analisi genetica è a sua volta compromesso in termini di attendibilità dalla presenza delle cellule contaminanti. Con questo studio si sono voluti sfruttare i diversi metodi di arricchimento per ottenere un campione dalle caratteristiche compatibili con la piattaforma DEPArray™, per poi isolare le CTC pure ed effettuarne l'analisi genetica.

***Cell Search® System, Veridex LLC, Raritan US***

Il sistema immunomagnetico di arricchimento e conta delle cellule EpCam positive rappresenta ad oggi il metodo di riferimento. Il sistema Veridex raccoglie le CTC in una cartuccia all'interno della quale vengono contate mediante software automatico; in base alla convenzione una cellula è considerata CTC se è positiva alla marcatura con citocheratina, che è indicativa dell'origine epiteliale della cellula e DAPI e negativa per il CD45, che caratterizza pressoché tutte le cellule ematiche (CK+/CD45-/DAPI+). In seguito alla conta, mediante procedura sviluppata per la successiva analisi al DEPArray™, le CTC possono essere estratte dalla cartuccia, caricate in un dispositivo monouso DEPArray™ A300K e isolate mediante piattaforma DEPArray™.

***Clear Cell FX System, Clearbridge Biomedics, Singapore***

Si tratta di un sistema microfluidico che riesce a separare le cellule del sangue dalle CTC; con questo sistema di arricchimento è possibile tarare la soglia dimensionale delle cellule target, con una conseguente compromissione del grado di contaminanti presenti nel campione arricchito. Per l'identificazione delle CTC, è necessario applicare una procedura di immunofluorescenza per discriminare le cellule contaminanti dalle CTC. Principalmente sono stati utilizzati anticorpi fluorescenti che riconoscono antigeni cellulari quali Citocheratina (CK), Molecole Epiteliali di adesione (EpCam), e CD45, oltre al DAPI come intercalante nucleare. Il campione così ottenuto potrà essere analizzato mediante DEPArray™ e le cellule d'interesse isolate per essere sottoposte ad analisi genetica.

***Parsortix PR1, Parsortix, Guildford, UK***

Anche in questo caso si tratta di un sistema microfluidico che sulla base di un principio dimensionale, trattiene le cellule target in una cartuccia e scarta le contaminanti. Similmente al metodo precedente, la sospensione cellulare ottenuta deve essere sottoposta a marcatura specifica mediante procedura di immunofluorescenza come già descritto. Il campione così ottenuto può quindi essere analizzato mediante DEPArray™ e le cellule d'interesse isolate per essere sottoposte ad analisi genetica.

***Screen Cell®, CellSieve®, ISET***

Questi e altri sistemi di arricchimento delle CTC mediante filtrazione del sangue pre-trattato, sfruttano un criterio dimensionale per trattenere sul filtro le cellule target, che in quanto cellule epiteliali sono spesso caratterizzate da dimensioni maggiori rispetto le cellule del sangue, che invece passano attraverso il filtro e vengono per la maggior parte scartate. Volendo usufruire della tecnologia DEPArray™ per isolare le cellule in maniera pura, l'aspetto più critico di questi metodi è quello di rimuovere le cellule dal filtro per poi effettuare le opportune procedure di immunofluorescenza e quindi l'analisi e l'isolamento delle cellule target al DEPArray™.

### ***Metodi immunomagnetici***

Altri metodi di selezione immunoenzimatica, ovvero mediante microbiglie coniugate ad anticorpi specifici, sono stati testati per l'arricchimento delle CTC (es. microbiglie coniugate ad anticorpo anti-EpCam) oppure per la deplezione delle cellule contaminanti (es. microbiglie coniugate a CD45 e/o a GPA, ecc).

- **Analisi genetica delle cellule tumorali circolanti**

Le cellule singole o come piccole aliquote (es. 5 -10 CTC) recuperate con DEPArray™ sono state ricostituite in un volume di 1µl di PBS e sottoposte ad analisi genetica mediante whole genome amplification da singola cellula, utilizzando *Ampli1*™ WGA Kit (Silicon Biosystems, Italia), oppure a whole transcriptome amplification con *Ampli1*™ WTA Kit (Silicon Biosystems, Italia).



### ***Ampli1™ WGA Kit***

Si tratta di un kit di amplificazione del DNA genomico espressamente sviluppato per l'amplificazione del DNA contenuto in una singola cellula. La metodica, una ligation-mediated PCR, sfrutta l'overhang prodotto dalla digestione enzimatica del DNA in una sequenza specifica per utilizzare un solo primer di amplificazione: grazie al quale non si verificano introduzioni di mutazioni dovute al random priming ed il prodotto di amplificazione risulta essere bilanciato (gli alleli di ciascun gene vengono amplificati in maniera omogenea).

*Ampli1™ WGA Kit* prevede inizialmente la lisi delle cellule seguita dalla digestione enzimatica del DNA con enzima di restrizione specifico e dalla ligazione del primer che servirà nella ultima reazione per l'amplificazione del DNA mediante PCR.

In termini quantitativi, la resa della reazione di *Ampli1™ WGA Kit* può essere diversa in rapporto all'integrità del DNA della cellula che è a sua volta può essere determinata dalla metodica di preparazione del campione (es. fissazione con paraformaldeide) o da campione stesso.

A tale proposito, è stato pubblicato un lavoro scientifico che correla le caratteristiche morfologiche delle CTC osservate al DEPArray™ con il prodotto di *Ampli1™ WGA* valutato nel saggio endpoint PCR *Ampli1™ QC kit* [22]; quest'ultimo è una multiplex di quattro amplificati di diversa lunghezza in paia di basi, ed il read-out è il numero di target amplificati sui quattro totali: ad esempio se 2 target su 4 sono positivi, il Genome Integrity Index sarà pari a 2, ovvero GII 2.

Ad una cellula integra contenente DNA non degradato corrisponde tipicamente un valore di GII pari a 4; più scende il valore di GII più il DNA è verosimilmente frammentato. Per ogni cellula recuperata in base al GII ottenuto con *Ampli1™ QC Kit* sono state selezionate le cellule da

sottoporre a successiva analisi del DNA. Infatti, l'amplificazione del DNA mediante *Ampli1™* WGA Kit e la valutazione del prodotto di WGA mediante *Ampli1™* QC Kit, non forniscono informazioni utilizzabili per la terapia del paziente; per questo è necessario procedere con analisi specifiche del DNA, quali l'analisi di mutazioni in geni correlati ai tumori: ad esempio i maggiori hot spot relativamente ai geni PIK3CA, KRAS, ALK, BRAF, possono essere rilevati sul prodotto di WGA con gli *Ampli1™* Sequencing Kits correlati.

Tuttavia, la complessità genetica del tumore non può essere soddisfatta dall'analisi delle mutazioni in uno o pochi hot-spots, e un metodo di analisi è necessario per una reale caratterizzazione molecolare delle CTC volta all'individuazione di informazioni genetiche utilizzabili per indirizzare la terapia del tumore.

Il prodotto dell'amplificazione delle singole cellule con *Ampli1™* WGA Kit può essere utilizzato come input per procedure di Next Generation Sequencing (NGS) grazie alle quali l'informazione genetica ottenuta dallo stesso campione è moltiplicata.

In particolare gli amplificati ottenuti con *Ampli1™* WGA Kit purificati, quantificati mediante Qubit (Invitrogen) e amplificati con il pannello *Ampli1™* CHP Custom Beta espressamente disegnato per essere compatibile con *Ampli1™* WGA Kit, sono stati sequenziati su piattaforma Ion Torrent PGM.

Il pannello *Ampli1™* CHP Custom Beta comprende 1267 mutazioni puntiformi e 12 CNV distribuiti su 50 geni rilevanti in oncologia.

#### ***Ampli1™* CHP Custom Beta**

ABL1	CDH1	EZH2	HNF1A	MET	PTEN	STK11
AKT1	CDKN2A	FBXW7	IDH1	MLH1	PTPN11	TP53

ALK	CSF1R	FGFR1	IDH2	MPL	RB1	VHL
APC	CTNNB1	FGFR2	JAK3	MYC	RET	
AR	DDR2	FGFR3	KDR	NOTCH1	SMAD4	
ATM	EGFR	FLT3	KIT	NRAS	SMARCB1	
BRAF	ERBB2	GNA11	KRAS	PDGFRA	SMO	
CCND1	ERBB4	GNAS	MAP2K1	PIK3CA	SRC	

Tab.3: Geni analizzati mediante *Ampli1*<sup>TM</sup> CHPCustom Beta

I dati grezzi ottenuti dal sequenziamento sono stati analizzati mediante l'utilizzo del software Torrent Suite per l'allineamento delle sequenze ottenute (*reads*) e per l'identificazione delle varianti ed in particolare delle mutazioni rilevanti in ambito oncologico (COSMIC mutations). Inoltre i dati generati sono stati utilizzati anche per l'identificazione delle *copy number variations* (CNV). Successivamente è stata effettuata un'ulteriore analisi con il software VEP (Variant Effect Predictor Ensembl Project) per verificare l'effetto delle mutazioni identificate sulla proteina prodotta.

### ***Ampli1*<sup>TM</sup> WTA Kit**

*Ampli1*<sup>TM</sup> WTA Kit è una procedura di amplificazione dell'RNA messaggero presente nella cellula, espressamente disegnata e validata per la singola cellula. La procedura si basa sul *fishing* dell'mRNA mediante un oligonucleotide che si lega in maniera specifica alla *PolyA Tail* caratteristica di ogni mRNA, che viene quindi isolato dal resto della cellula e retro-trascritto generando molecole di DNA complementare (cDNA), successivamente amplificate mediante PCR

generando una *library* di ampliconi a doppio filamento.

Similmente a quanto visto per l'analisi del DNA, *Ampli1*<sup>TM</sup> WTA Kit è associato al *Ampli1*<sup>TM</sup> QC Kit, ovvero una multiplex di tre diversi ampliconi utili per la comprensione della resa della procedura di amplificazione dell'mRNA e per la selezione dei campioni da analizzare.

A valle dell'amplificazione mediante *Ampli1*<sup>TM</sup> WTA Kit, limitatamente alle cellule selezionate sono state effettuate analisi di espressione genica mediante microarray su piattaforma Agilent oppure con metodica RNA-Seq su piattaforma Ion Proton.

L'aspetto più interessante ed innovativo dell'approccio proposto per l'analisi della singola cellula, è che le procedure *Ampli1*<sup>TM</sup> WTA Kit e *Ampli1*<sup>TM</sup> WGA Kit sono combinabili, ovvero dalla stessa singola cellula, è possibile effettuare entrambe le procedure, arrivando ad avere informazioni genetiche puntuali prive dell'inquinamento genetico proveniente dalla presenza di cellule contaminanti che si riscontra con le metodiche tradizionali.

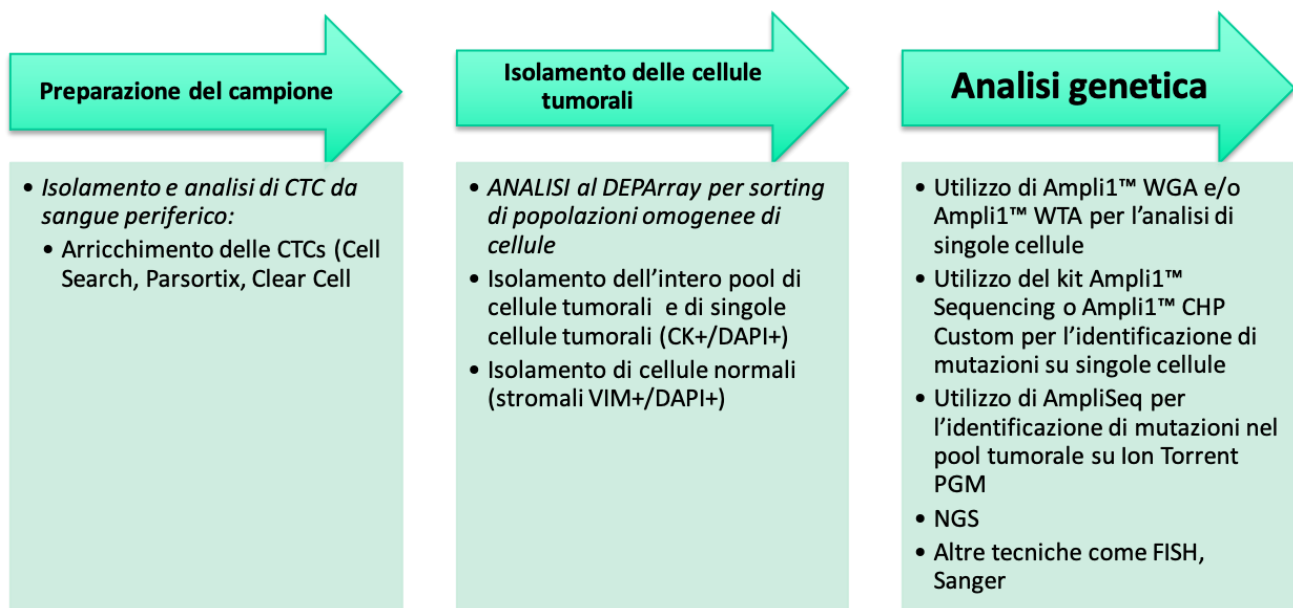


Figura 1. Flow-chart del processo di analisi dei campioni biologici.

- **DEPArray™ Sorting System**

L'isolamento delle cellule tumorali dai campioni processati è stato effettuato mediante DEPArray™ Sorting System, un sistema computerizzato, composto da hardware, software ed elementi mono uso, che permette di isolare cellule pure, da una singola fino ad alcune centinaia.

Per poter essere analizzato con DEPArray™ un campione biologico deve essere preparato fino ad essere una sospensione di cellule, marcate in fluorescenza; una volta ridotto ad un volume di 13 µl, il campione può essere iniettato nella cartuccia monouso denominata DEPArray™ A 300K, e

questa caricata nella piattaforma DEPArray™. Il campione viene quindi automaticamente caricato nell'area attiva della cartuccia, dove le cellule vengono intrappolate in una sorta di gabbie virtuali di elettroforesi che vengono a formarsi con l'attivazione dei voltaggi in fase e controfase. Grazie al microscopio e alla camera CMOS integrati nella piattaforma DEPArray™, la superficie del chip viene quindi scansionata nei cinque canali di fluorescenza e nel campo chiaro, e le immagini e per ciascun evento le informazioni di parametri quali intensità del segnale per ciascun canale fluorescenza, circolarità e posizione nel chip, vengono collezionate in un apposito software (CellBrowser™). Le cellule presenti nel campione possono in questo modo essere revisionate e selezionate. Mediante l'interfaccia grafica dell'apposito software (Cell Director™) tutte le cellule selezionate vengono direzionate e convogliate verso una camera di parcheggio prima e poi, individualmente o a gruppi, verso l'area di exit, dove viene attivato un flusso di buffer pulito che recupera le cellule nel supporto selezionato (es provetta da 0,2ml).

Con il DEPArray™ System, cellule pure ed intatte possono essere recuperate e rese disponibili per le più complesse applicazioni di analisi delle singole cellule. Inoltre, assicurando il recupero individuale di cellule d'interesse, la tecnologia DEPArray™ rende possibile analisi genomiche e di espressione genica fino al livello della singola cellula e grazie alla sua tecnologia delicata sulle cellule, e al processo veloce, rende possibile l'isolamento di cellule vive per dare origine a colture cellulari o xenotrapianti per modelli sperimentali.

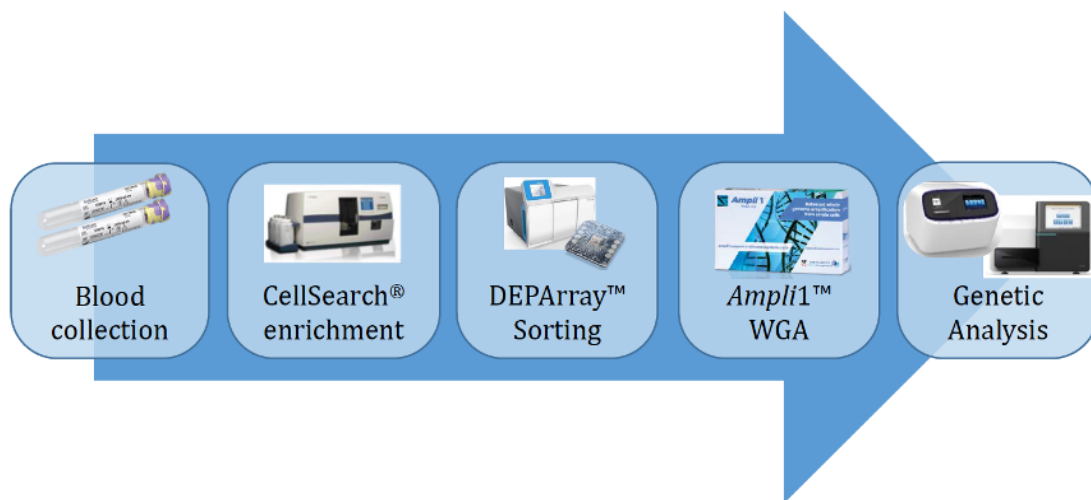


Figura 2. Work-flow dello studio.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Complessivamente, nel corso del triennio del Dottorato, sono stati raccolti 190 campioni ematici; di questi 94 sono stati processati con Cell Search® System, 67 con Parsortix, 6 campioni non sono stati elaborati per riscontro di positività ad anticorpi anti HCV e i rimanenti 23 campioni sono stati processati con kit CEC e CMC.

Dei 94 campioni processati con Cell Search® System, 19 avevano una conta di CTC superiore a 4. Di questi 19, 15 sono stati processati mediante piattaforma DEPArray™ Sorting System con recupero di cellule in 14 campioni, 13 dei quali sono stati processati con il downstream molecolare.

Nell'ambito dei 94 campioni analizzati, le tipologie di neoplasie incluse erano così distribuite:

59 (64%) campioni di pazienti con neoplasia polmonare non a piccole cellule, istologia adenocarcinoma, 20 (21%) campioni di pazienti con microcitoma polmonare, 1 (1%) campione con neoplasia a partenza del tratto bilio-pancreatico, 6 (6%) con neoplasia renale, 2 (2%) campioni da paziente con neoplasia ad origine sconosciuta, 1 (1%) campione da paziente con neoplasia ovarica, 1 (1%) campione da paziente con melanoma e 3 (4%) pazienti con neoplasia prostatica.

In 10 dei 20 campioni provenienti da pazienti affetti da microcitoma polmonare, sono state isolate delle cellule tumorali circolanti in numero  $> 5$ . Per quanto concerne invece i casi relativi a pazienti con diagnosi di adenocarcinoma polmonare in stadio IV, la percentuale di campioni con un numero di CTC  $> 5$  è nettamente inferiore, pari al 10% (6 casi).



In entrambi i campioni del paziente con neoplasia ad origine sconosciuta, invece, è stata evidenziata la presenza di CTC in numero superiore a 5. Infine, su 3 pazienti con neoplasia polmonare, in un caso è stato possibile isolare CTC con numero > 5.

L'isolamento delle cellule tumorali circolanti nel plasma di una paziente arruolata nel progetto ha consentito di effettuare ulteriori indagini al fine di identificare potenziali meccanismi di resistenza alla terapia con inibitori di ALK nei pazienti affetti da neoplasia polmonare non a piccole cellule ALK-riarrangiata.

La traslocazione di ALK, identificata in circa il 2-8% dei pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule, comporta la produzione di una proteina chinasi alterata coinvolta nella crescita tumorale [23]. Tale alterazione genetica può essere efficacemente bloccata da farmaci a bersaglio molecolare tra cui il Crizotinib. La maggior parte dei pazienti tuttavia, dopo un'iniziale risposta a questo farmaco, sviluppano resistenza con conseguente ripresa della crescita tumorale [24-27]. I meccanismi di tale resistenza, denominata "resistenza secondaria o acquisita", comprendono l'amplificazione dei geni di fusione ALK, nuove mutazioni a carico del dominio tirosin-chinasico di ALK o l'attivazione di pathway alternativi come EGFR, KIT e insulin-like growth factor receptor 1. Alcuni pazienti tuttavia, non rispondono sin dall'inizio alle terapie con farmaci inibitori di ALK, manifestando quindi una resistenza de novo: i meccanismi di questa resistenza primaria sono ancora in gran parte sconosciuti e i dati disponibili in letteratura sono limitati [28-29].

Abbiamo quindi analizzato il caso di una giovane paziente affetta da adenocarcinoma polmonare in stadio IV con traslocazione di ALK trattata con Crizotinib in 2° linea.

La paziente, una donna di 48 anni, è stata inviata alla nostra attenzione a seguito di una diagnosi di NSCLC ALK-riarrangiato con localizzazioni secondarie ossee, epatiche, polmonari e linfonodali mediastiniche e laterocervicali e versamento pleurico. La paziente si presentava sintomatica per dispnea da sforzo e tosse. Al momento della diagnosi, in Italia non era ancora registrato in prima linea alcun farmaco inibitore di ALK per cui la paziente ha iniziato una chemioterapia di 1° linea secondo schema cisplatino in combinazione con pemetrexed ogni 3 settimane. A seguito di un iniziale beneficio clinico, le condizioni cliniche della paziente sono rapidamente peggiorate per cui è stata anticipata la TC di rivalutazione che è stata quindi eseguita dopo 3 cicli di chemioterapia, con evidenza di progressione di malattia legata all'incremento dimensionale e numerico dei secondarismi polmonari e alla comparsa di linfagite polmonare. La paziente è stata quindi avviata a terapia di 2° linea con Crizotinib 250 mg due volte/die, ottenendo un rapido, seppur transitorio, miglioramento clinico generale. La successiva TC di ristadiatione, eseguita a circa 3 mesi dall'avvio del trattamento, ha evidenziato una risposta radiologica mista con riduzione importante delle linfadenopatie mediastiniche (Figura 3) ma significativo peggioramento del quadro linfangitico polmonare e del versamento pleurico (Figura 4). La paziente ha quindi ricevuto una terza linea di terapia con Ceritinib 750 mg/die ma le condizioni cliniche generali sono rapidamente deteriorate e la paziente è deceduta dopo solo alcuni giorni dall'avvio del nuovo trattamento.

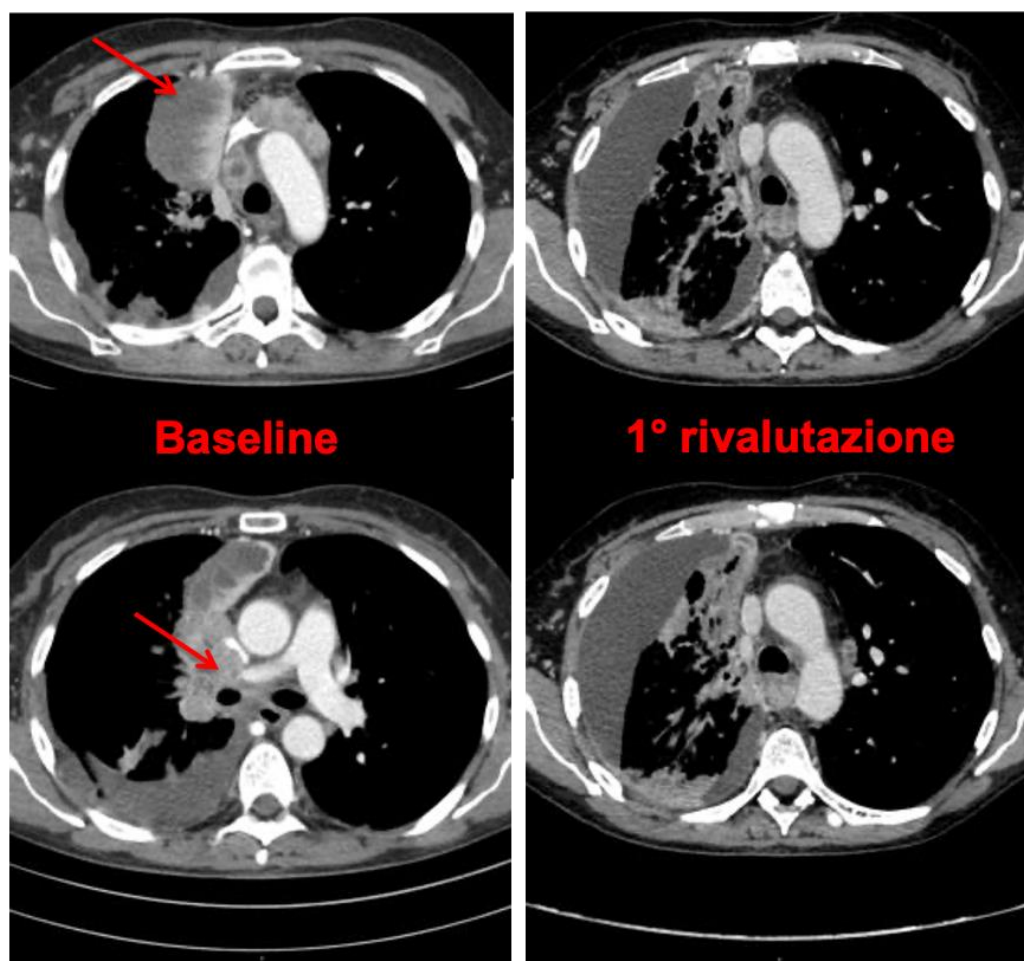


Figura 3. Adenopatie mediastiniche al basale (vedi freccia, immagini a sinistra) e alla prima rivalutazione (immagini a destra).

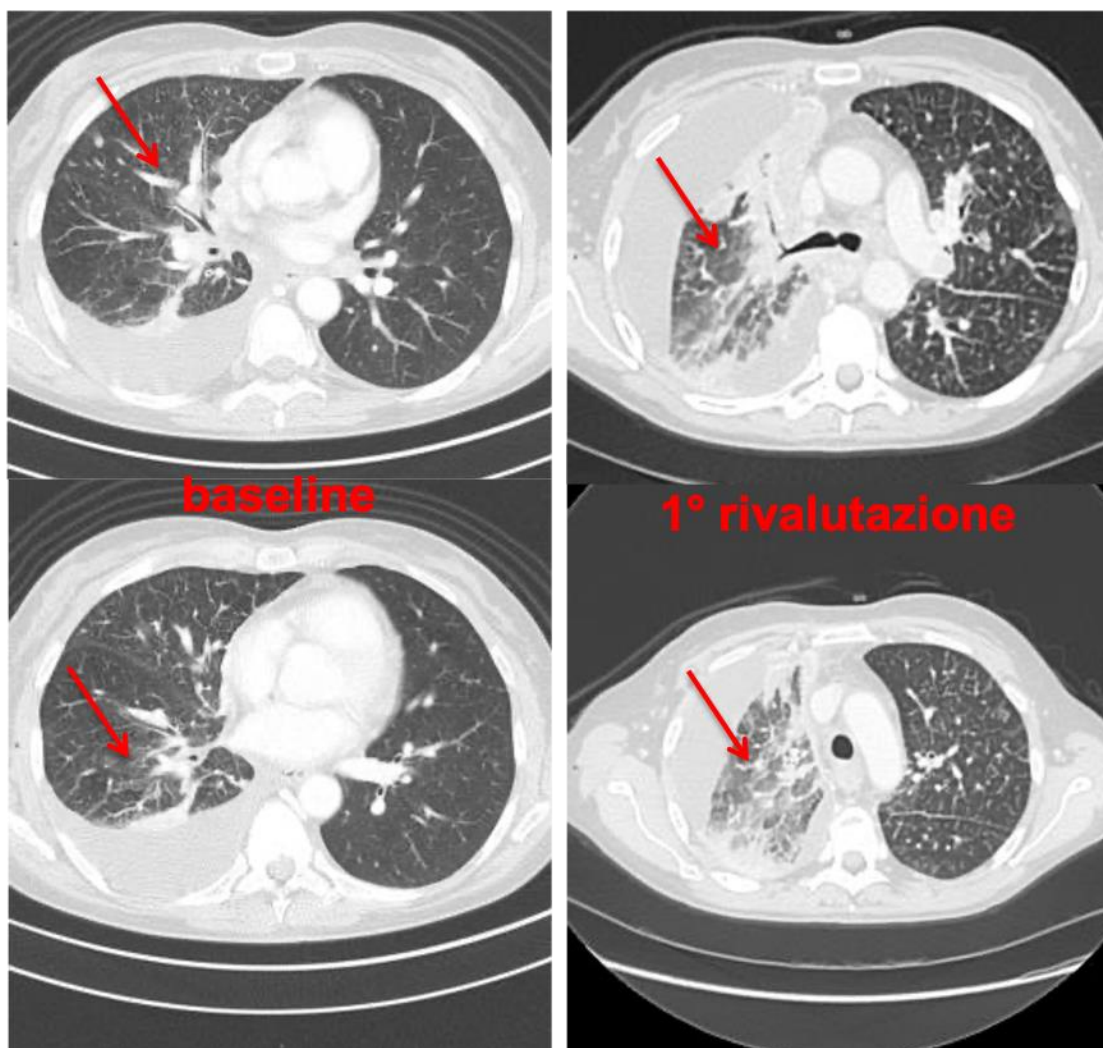


Figura 4. Linfagite polmonare al basale (immagini a sinistra, vedi freccia) e alla prima rivalutazione (immagini a destra)

La presenza di riarrangiamento di ALK è stata inizialmente identificata in FISH utilizzando la sonda Vysis ALK Break Apart FISH Probe kit (Abbott Laboratories) su citoincluso ottenuto da versamento pleurico che era stato drenato al momento della diagnosi di malattia (Figura 5).

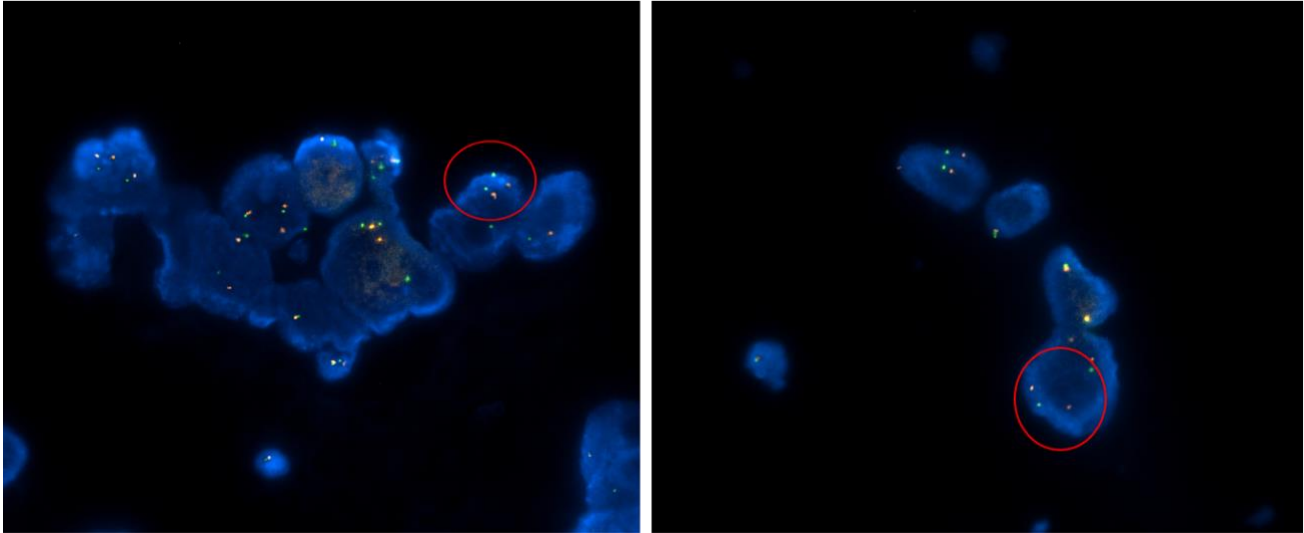


Figura 5. Break-Apart FISH per ALK

Al fine di identificare possibili meccanismi di resistenza primaria a Crizotinib, utilizzando cellule tumorali ricavate da versamento pleurico drenato alla progressione, è stata effettuata un'analisi di un panel mutazionale ad ampio spettro su piattaforma Ion Torrent™ PGM. I risultati di quest'analisi hanno confermato la presenza della traslocazione di ALK senza però evidenziare alcuna nota mutazione di ALK associata a resistenza a Crizotinib. Come dato aggiuntivo, è stata identificata la presenza di amplificazione dell'oncogene MYC con un numero di copie di gene pari a circa 8.

Abbiamo quindi voluto verificare se l'amplificazione di MYC fosse presente anche prima di iniziare il trattamento con Crizotinib: l'analisi FISH su citologico del versamento pleurico drenato prima dell'avvio della terapia ha confermato la presenza di amplificazione di MYC (Figura 6).

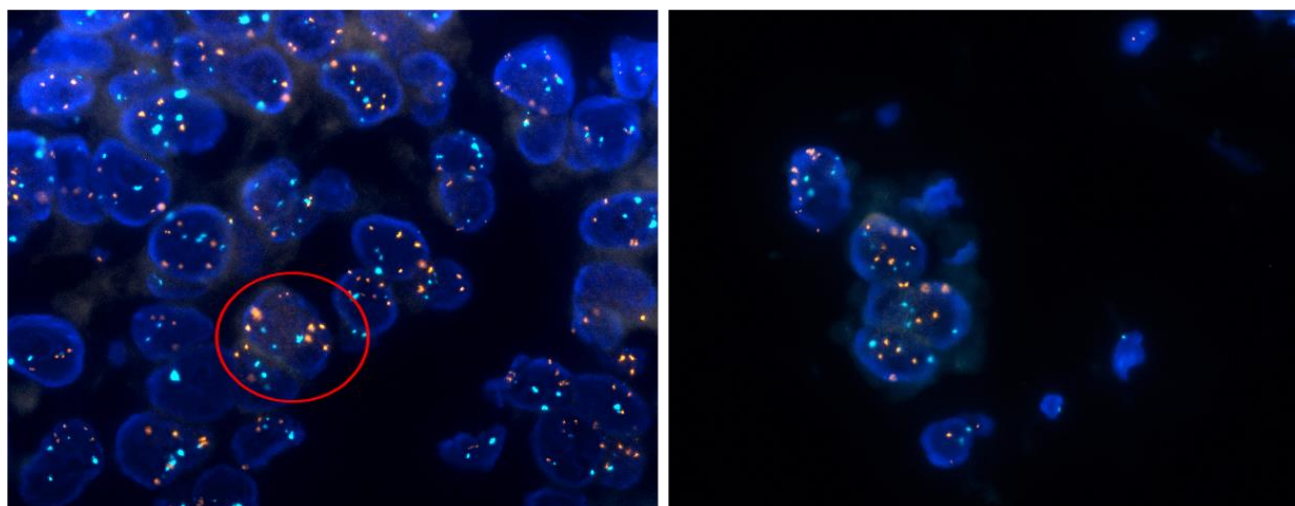


Figura 6: FISH su citologico del versamento pleurico con evidenza di amplificazione di MYC.

Analogamente, è stato analizzato un campione di sangue, prelevato al momento della progressione, con isolamento delle cellule tumorali circolanti (CTCs) mediante CELLSEARCH®. Il campione di cellule così ottenuto è stato quindi analizzato al DEPArray™ per il sorting di popolazioni omogenee di cellule cui è seguita l'analisi genetica mediante whole genome amplification da singola cellula, utilizzando Ampli1™ WGA Kit (Silicon Biosystems, Italia). Anche queste analisi aggiuntive hanno confermato la presenza di un'amplificazione della regione del genoma comprendente il gene MYC.

Al fine di valutare il possibile ruolo patogenetico dell'amplificazione di MYC quale meccanismo di resistenza primaria agli inibitori di ALK, abbiamo utilizzato la linea cellulare umana H3122 caratterizzata da traslocazione EML4-ALK trasfettandola con vettore lentivirale (pLenti-C-mGFP-P2A-Puro, Origene, Rockville, MD) che trasporta sequenze cDNA relative a MYC. I livelli di mRNA di

MYC sono stati quindi valutati mediante RT-PCR e confrontati con i livelli espressi dalla linea cellulare HL-60, una linea umana di cellule di leucemia promielocitica caratterizzata da amplificazione di MYC (Figura 7).

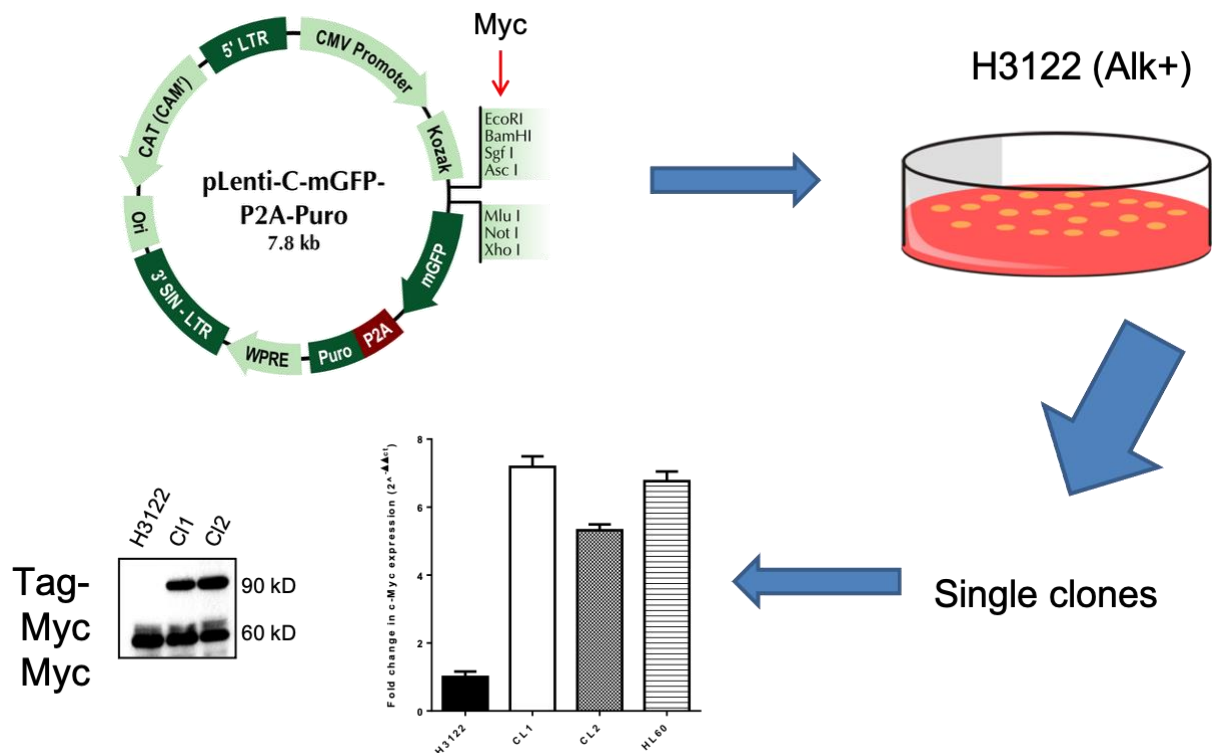


Figura 7. La linea cellulare umana H3122 viene trasfettata con vettore lentivirale (pLenti-C-mGFP-P2A-Puro, Origene, Rockville, MD) che trasporta sequenze cDNA relative a MYC. I livelli di mRNA di MYC sono stati quindi valutati mediante RT-PCR e confrontati con i livelli espressi dalla linea cellulare HL-60, una linea umana di cellule di leucemia promielocitica caratterizzata da amplificazione di MYC

I cloni caratterizzati dall'iperespressione di MYC hanno mostrato all'analisi Western Blot livelli aumentati di espressione di ciclina D ed E, due proteine chiave dei checkpoint G1-S del ciclo cellulare, con conseguente iperattivazione della crescita cellulare rispetto alle cellule parentali H3122 (Figura 8).

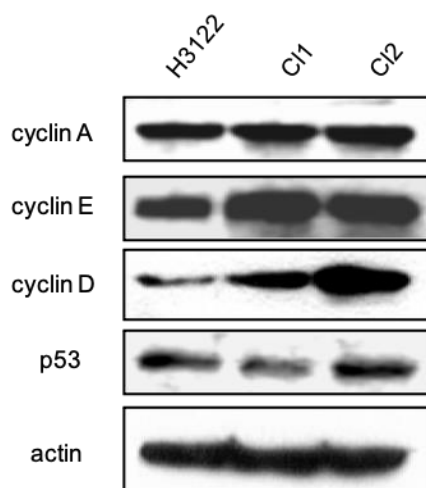


Figura 8. I cloni con iperespressione di MYC presentano aumentati livelli di espressione di ciclina D ed E alla Western Blot.

Per valutare la sensibilità a specifici inibitori di ALK, i cloni cellulari con iperespressione di MYC sono quindi stati testati con Crizotinib e Alectinib dimostrando una riduzione della sensibilità ad entrambi i farmaci, con aumento dei valori di IC50 rispetto alle cellule parentali H3122 (Figura 9).



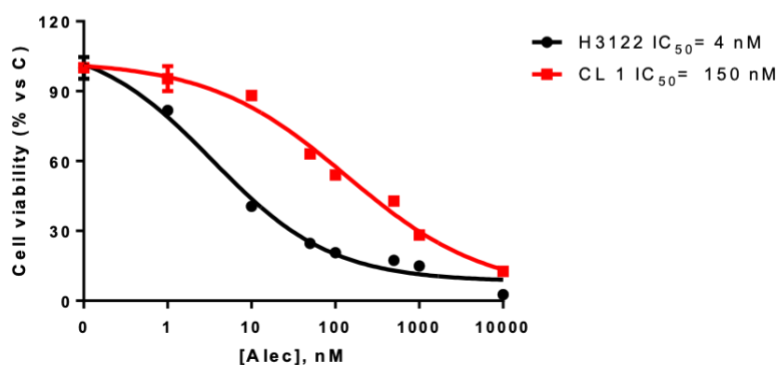
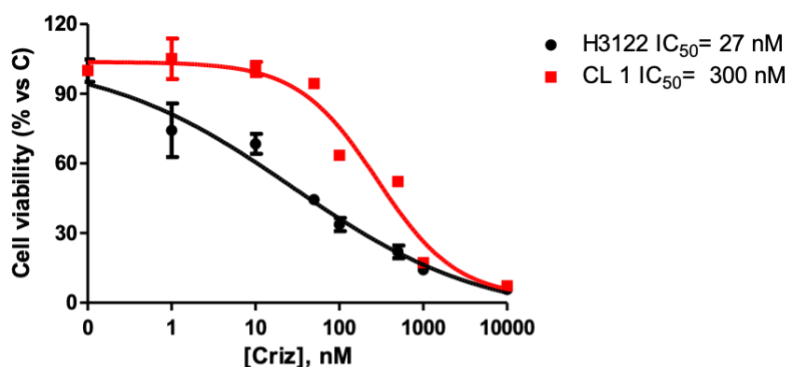


Figura 9. Sensibilità dei cloni cellulari con iperespressione di MYC a crizotinib (immagine in alto) e alectinib (immagine in basso).

I risultati di tale analisi sembrano quindi indentificare nell'iperespressione di MYC un potenziale meccanismo di resistenza agli inibitori di ALK.

Al fine di superare quindi la resistenza conferita dall'iperespressione di MYC, abbiamo valutato l'effetto derivante dall'aggiunta a crizotinib/alectinib di uno specifico inibitore di MYC dimostrando un effetto sinergistico con riduzione della proliferazione dei cloni MYC iperespressi e ripristino della sensibilità agli inibitori di ALK (Figura 10).

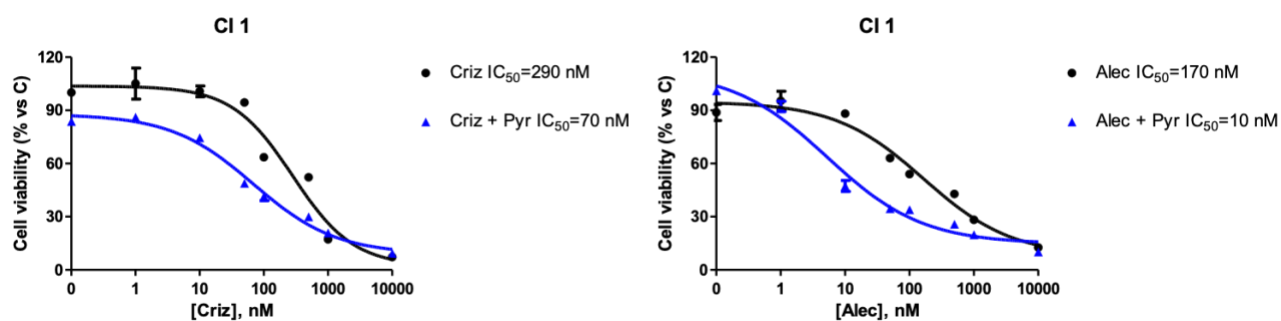


Figura 10. Effetto sinergico di crizotinib (a sinistra) o alcatinib (a destra) e inibitore specifico di MYC.

Infine, tenendo conto dell'effetto osservato sui livelli di cicline D/E causato dall'iperespressione di MYC [30-32], abbiamo testato l'effetto di Palbociclib (un inibitore altamente selettivo delle cicline kinasi-dipendenti CDK4/6), osservando un effetto sinergistico sull'inibizione della proliferazione cellulare quando utilizzato in combinazione con Crizotinib e Alectinib (Figura 11).

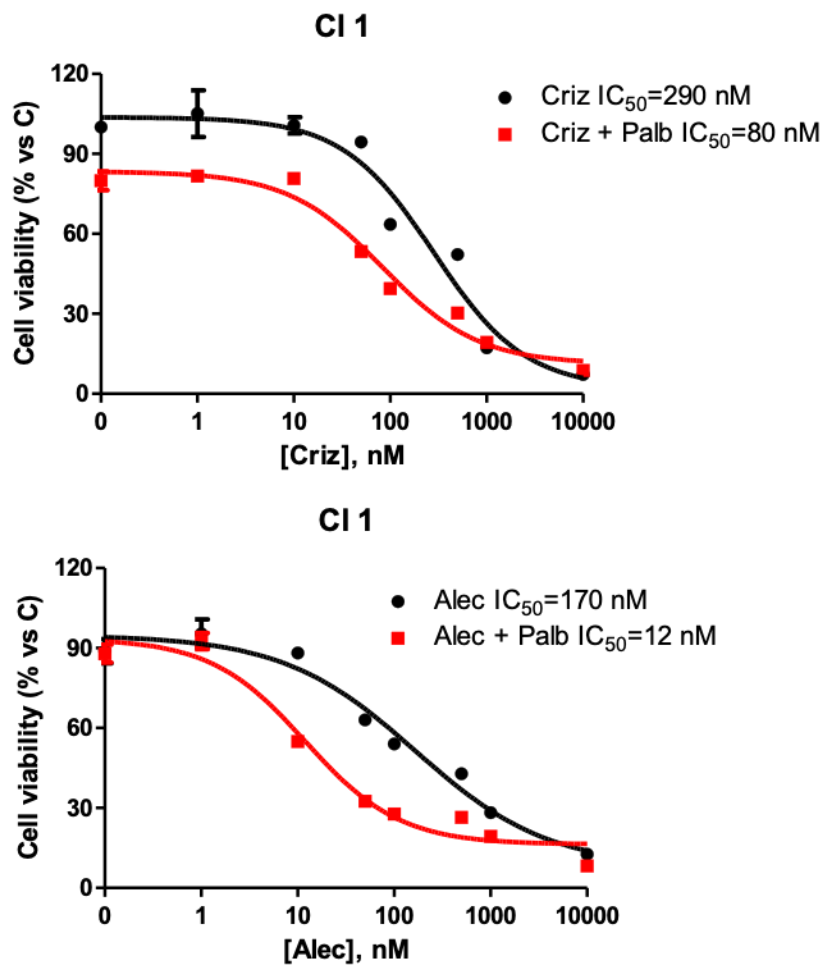


Figura 12. Effetto sinergistico sull'inibizione della proliferazione cellulare derivante dall'aggiunta a crizotinib (in alto) o alectinib (in basso) di palbociclib.

In sintesi: la presenza del riarrangiamento di ALK e dell'amplificazione di MYC è stata identificata e confermata mediante differenti metodiche (FISH e NGS) su differenti tipologie di prelievi (citologia pre-terapia, campione citologico alla progressione e CTCs), evidenziando quindi un possibile ruolo di MYC quale meccanismo di resistenza primaria a crizotinib. Abbiamo inoltre dimostrato l'efficacia e

l'accuratezza di CELLSEARCH® e DepArray nell'isolamento e caratterizzazione delle cellule tumorali circolanti in campioni ematici di pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule.

In un altro caso, l'isolamento delle cellule tumorali circolanti nel plasma di una paziente arruolata nel progetto ha consentito di effettuare ulteriori indagini al fine di identificare la potenziale sede di partenza di una neoplasia a origine ignota, confrontando i risultati ottenuti su tessuto tumorale con quelli ottenuti sulle cellule tumorali circolanti isolate.

In fase diagnostica, l'analisi su gDNA eseguita utilizzando il pannello di FoundationOne CDx sul campione biotico aveva evidenziato un'amplificazione di FGFR2 e di CCNE1, nonché la mutazione di ARID1A R1276\*.

La paziente è stata quindi arruolata nello studio: al basale, previo arricchimento con CellSearch® sono state isolate 12 CTC con DEPArray™. La successiva analisi genetica sulle CTC utilizzando il kit *Ampli1*™ LowPass ha evidenziato un'amplificazione a carico del gene FGFR2 e una perdita di eterozigosi della regione APC (Figura 13).

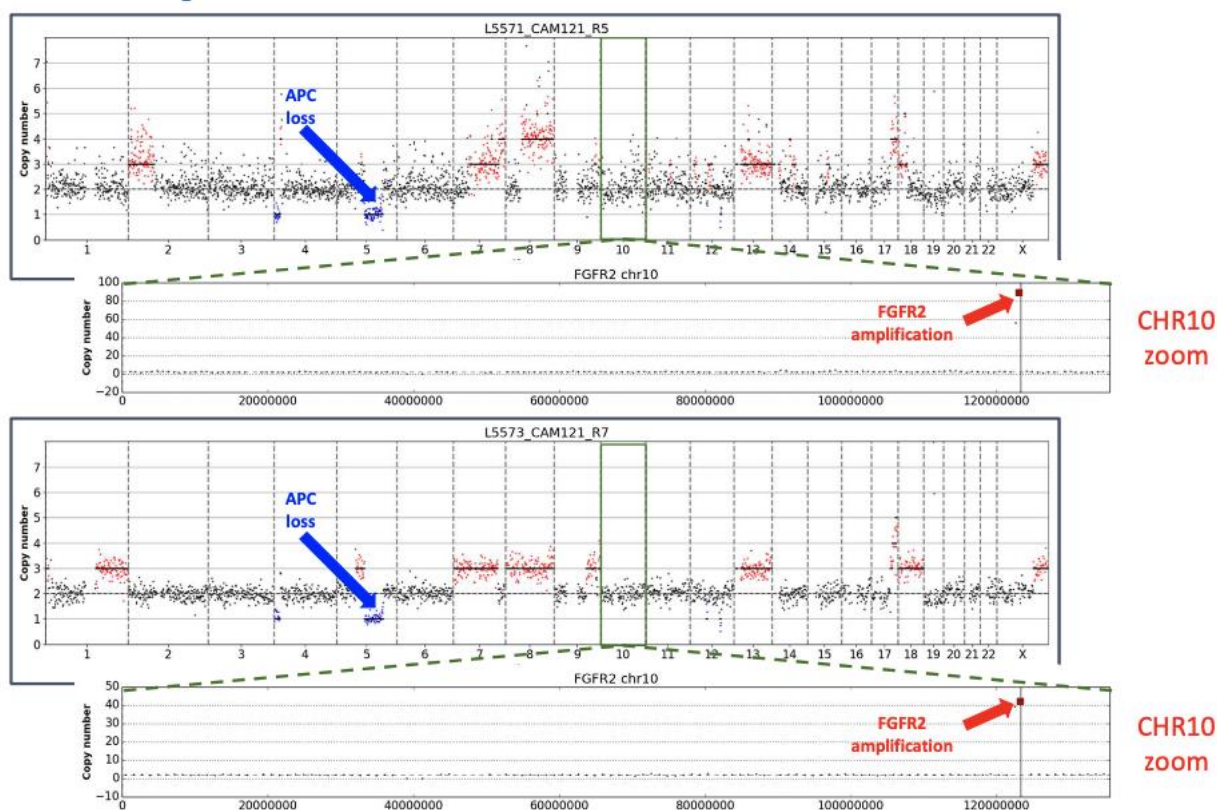


Figura 13. Copy-number- alteration (CNA) profiles in due CTC isolate.

L'analisi genetica sulle CTC è stata condotta quindi anche utilizzando il kit *Ampli1*<sup>TM</sup> OncoSeek, confermando i dati emersi con il kit LowPass, ossia la presenza di amplificazione di FGFR2 e la presenza di mutazione a carico APC (p.T1556Nfs\*3) - (Figura 14).

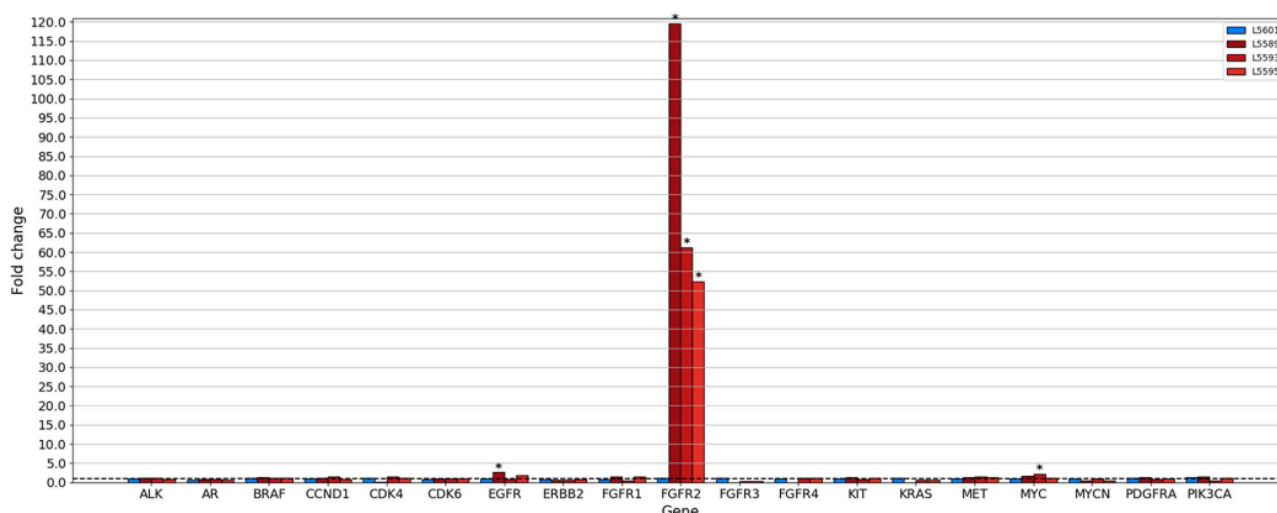


Figura 15. Copy Number Aberrations.

Il gene FGFR2 codifica per il recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR) 2. La famiglia dei recettori FGFR ricopre un ruolo centrale nella differenziazione cellulare, crescita e angiogenesi mediante il legame con gli specifici ligandi. L'amplificazione o le mutazioni attivanti a carico dei recettori della famiglia FGFR può tradursi in un'iperattivazione della pathway favorendo la crescita tumorale [33-35].

L'amplificazione a carico del gene FGFR2 è associata, in letteratura, a differenti tipologie di neoplasie, con un ruolo carcinogenetico predominante nei tumori polmonari, pancreatici e stomaco [33-35].

Il gene APC è invece un oncosoppressore che è stato inizialmente caratterizzato sulla base del ruolo predominante che la sua inattivazione svolge nella carcinogenesi del tumore colo-rettale. Le mutazioni a carico di APC sono descritte in una percentuale variabile compresa tra il 3 e il 22% dei carcinomi gastrici, con una frequenza più alta nei tumori a istotipo diffuso e intestinale [36-39].

Sulla base delle alterazioni molecolari identificate e dopo un'attenta ricerca della letteratura in merito, abbiamo avanzato l'ipotesi che la neoplasia fosse a partenza gastrica/intestinale.

La paziente è stata pertanto trattata quindi con una chemioterapia di prima linea a base di 5-fluorouracile e oxaliplatino, ottenendo una risposta parziale di malattia e una sopravvivenza libera da progressione di malattia di circa 9 mesi.

Abbiamo quindi confrontato anche i risultati ottenuti con piattaforma FoundationOne CdX utilizzando DEPAarray™ su campione bioptico: in particolare, il gDNA estratto da campione bioptico fissato in formalina e incluso in paraffina è stato processato con DEPAarray™ LibPrep Kit LowPass Whole Genome Sequencing per confermare l'amplificazione di FGFR2 e CCNE1 e per valutare la presenza di perdita di eterozigosi della regione APC mentre DEPAarray™ OncoSeek Panel è stato utilizzato per confermare l'amplificazione di FGFR2 e valutare la presenza di mutazione inattivante di APC (APC:p.T1556Nfs\*3). Non è stato possibile evidenziare con OncoSeek Panel la mutazione ARID1A R1276\* emersa con FoundationOne CdX poiché tale gene non è compreso.

Alla prima analisi LowPass il campione è risultato altamente inficiato dalla presenza di cellule non tumorali in alta percentuale, con un lieve trend tumorale identificabile (Figura 16).

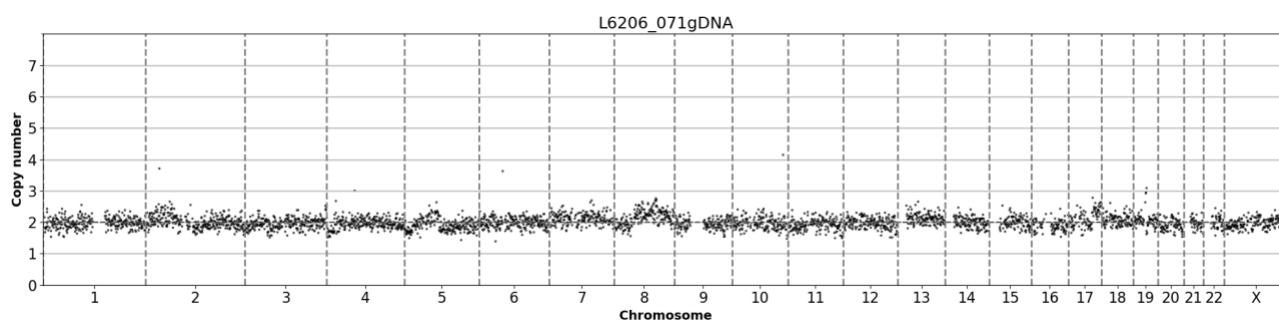


Figura 16. Risultato dell'analisi LowPass su gDNA estratto da campione FFPE.

Impostando tuttavia un valore di contaminazione di cellule normali al 70%, molte alterazioni si sono rese evidenti, nonostante comunque una sostanziale riduzione della qualità del segnale (figura 17).

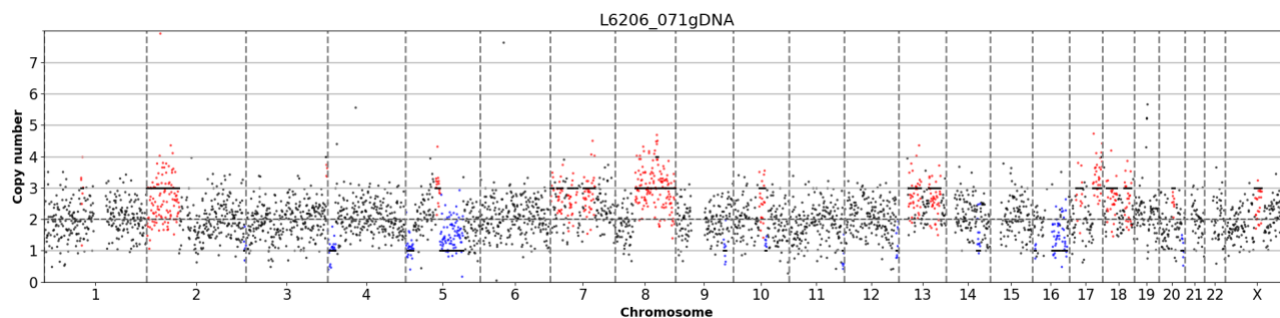


Figura 17. Risultato dell'analisi LowPass su gDNA estratto da campione FFPE con valore di contaminazione di cellule normali preimpostato al 70%.

Il profilo ottenuto impostando il livello di contaminazione del campione al 70% appare comunque affidabile, come emerge dal confronto tra i risultati ottenuti su CTC e su tessuto (Figura 18).

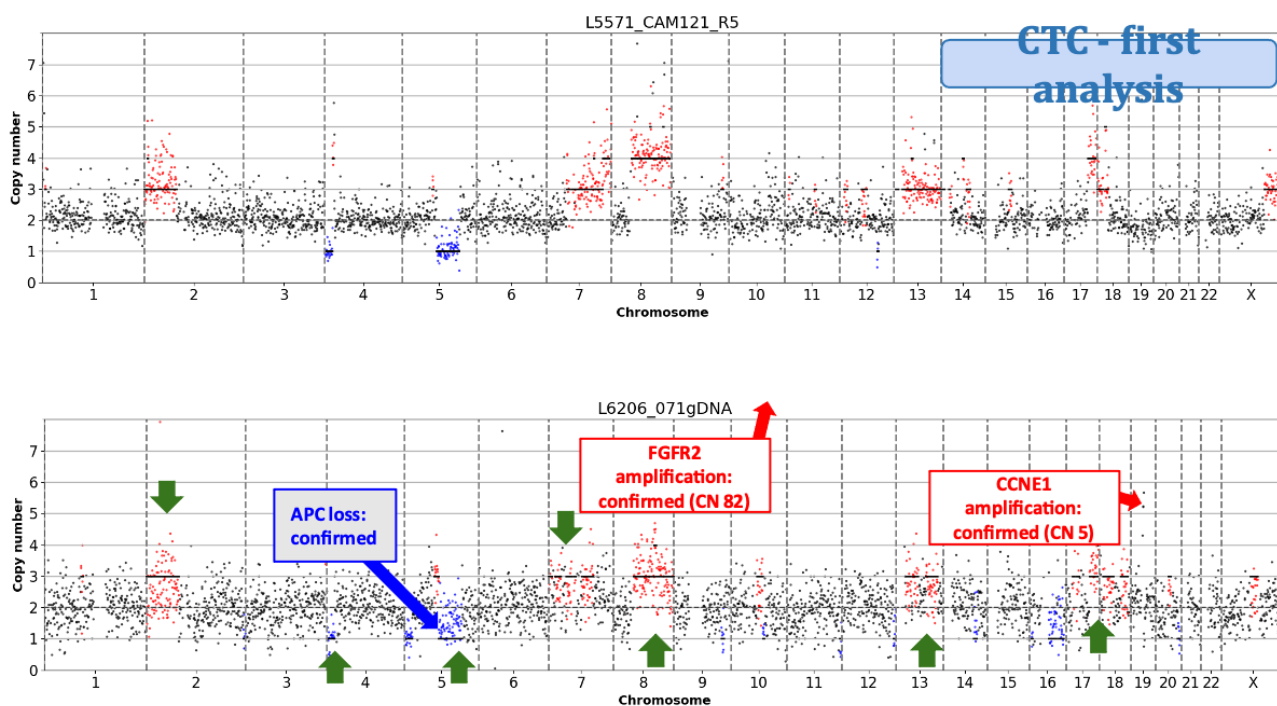




Figura 18. I copy-number profiles sono molto simili e quasi tutte le alterazioni evidenziate nell'analisi delle CTC sono riscontrate anche nel gDNA del tessuto (frecche verdi).

All'analisi DEPAarray™ OncoSeek su gDNA di tessuto è stata confermata la presenza di mutazione a carico di APC (APC:p.T1556Nfs\*3) e l'amplificazione di FGFR2.

L'analisi delle cellule tumorali circolanti ricavate dal sangue periferico dei pazienti può offrire un ampio spettro di opportunità nel campo della medicina oncologica di precisione. Uno degli aspetti chiave di quest'ultima è proprio il miglioramento delle capacità diagnostico-terapeutiche del cancro [40-42].

Il progetto denominato “The Cancer Genome Atlas” è stato in grado di fornire un'estesa caratterizzazione molecolare di centinaia di neoplasie che non solo ha condotto all'identificazione di molteplici alterazioni molecolari e relativo ruolo patogenetico in differenti tipi di tumori, ma è stato anche in grado di definire molteplici potenziali bersagli terapeutici [41]. Tutto ciò si è quindi tradotto nella scoperta e quindi progressiva commercializzazione di numerosi trattamenti oncologici mirati che gradualmente stanno rivoluzionando il panorama terapeutico in molteplici tipologie di neoplasie. Pertanto, la medicina di precisione ha progressivamente modificato il concetto per il quale “un trattamento è adatto per tutti” a una realtà in cui a ciascun paziente corrisponde una terapia specifica. Tuttavia, la complessa biologia dei tumori si accompagna a un significativo grado di eterogeneità sia intratumorale sia inter-tumorale [42-45], tale per cui, al fine di ottenere una migliore caratterizzazione della neoplasia, sarebbero necessarie ripetute biopsie a carico del tumore primitivo e delle eventuali localizzazioni secondarie. Per ovvie ragioni, tale approccio non è perseguibile nella pratica clinica.

Contrariamente alle biopsie tissutali, le biopsie liquide non hanno limitazioni in termine di frequenza di prelievo o di accessibilità tumorale e relativi rischi legati alla manovra biotica. La biopsia liquida infatti prevede l'identificazione e successiva analisi in differenti tipi di fluidi biologici di specifici analiti; nello specifico dei pazienti oncologici, gli analiti tipicamente ricercati comprendono le cellule tumorali circolanti, il DNA libero circolante (circulating cell-free DNA – cfDNA), il RNA libero circolante (circulating cell-free RNA – cfRNA), le vescicole extracellulari (EV), le piastrine onco-educate (tumor-educated platelets – TEPs), proteine e altri metaboliti [46-48]. Benché l'isolamento delle cellule tumorali circolanti sia risultato difficoltoso dal punto di vista tecnico in relazione alla loro scarsa presenza nel sangue periferico, esse rappresentano uno degli strumenti più studiati nell'ambito delle biopsie liquide, in quanto in grado di fornire informazioni circa le caratteristiche biologiche e molecolari del tumore primitivo e delle metastasi nonché di seguire la dinamica evolutiva e l'eterogeneità dei tumori, identificando precocemente anche l'insorgenza di meccanismi di resistenza [46, 49-52].

Le evidenze scientifiche che le CTC possano essere utilizzate quali surrogati tissutali per monitorare la presenza o comparsa di resistenza farmacologica ai trattamenti deriva essenzialmente da due osservazioni. Innanzitutto, l'inoculazione di CTC in topi immunodeficienti porta allo sviluppo di neoplasie con le medesime caratteristiche delle CTC che mostrano peraltro anche lo stesso tipo di risposta ai trattamenti chemioterapici del donatore [53]. In secondo luogo, l'analisi molecolare di singole CTC ha mostrato un profilo somatico di gene copy-number differente nei pazienti con microcitoma polmonare chemio-sensibile e chemio-refrattario [54].

Nel caso presentato in questo lavoro, l'identificazione dei CTC e la loro successiva analisi genica ha consentito di evidenziare un potenziale meccanismo di resistenza primaria al crizotinib, un inibitore di ALK di prima generazione.

Nella ricerca clinica in generale, l'analisi delle CTC è stata utilizzata anche per la stratificazione prognostica nonché per il monitoraggio della progressione di malattia di differenti tipi di tumori solidi, tra cui il carcinoma mammario, il microcitoma polmonare, il tumore polmonare non a piccole cellule, il tumore coloretale e quello prostatico [55-60]. Tuttavia, le CTC quale strumento di biopsia liquida ad oggi non hanno ancora dimostrato a pieno il loro potenziale informativo circa la possibilità di una gestione altamente personalizzata del paziente oncologico. Il numero relativamente limitato di CTC nel sangue periferico nonché la sensibilità degli strumenti analitici utilizzati per identificare e isolare le CTC rimangono due dei problemi principali ancora parzialmente irrisolti [59-60]. A tal fine, uno sforzo globale è tuttora in corso al fine di giungere a una standardizzazione dei metodi di ricerca delle CTC al fine di superare le difficoltà tecniche legate all'arricchimento, identificazione, isolamento e analisi NGS delle CTC.

In effetti, molteplici approcci innovativi hanno portato a un'espansione importante del campo di ricerca delle CTC; tuttavia, nonostante alcuni risultati promettenti abbiano evidenziato il potenziale ruolo clinico delle CTC, la loro utilità nella pratica clinica rimane ancora da chiarire. Ad esempio, ad oggi una delle difficoltà incontrate deriva dal campionamento delle CTC in quanto esse vengono ricercate all'interno di una provetta di sangue da 7.5 ml. Stanno infatti emergendo delle evidenze scientifiche che dimostrano come aumentando il quantitativo di sangue prelevato da 7.5 mL a 30 mL, si aumenti la probabilità di isolare CTCs passando dal 13% al 47% di successo [61]. Un altro aspetto riguarda l'eventuale differenza in termini di isolamento di CTC che esiste tra sangue periferico venoso o arterioso. Terai et al. Infatti hanno dimostrato come in tutti i campioni di sangue arterioso analizzati

siano state isolate CTC mentre nel sangue venoso, solo nella metà dei dei casi c'è stato un isolamento di CTC [62]. Ad oggi sono certamente necessari degli studi che coinvolgano ampie coorti di pazienti con l'obiettivo di chiarire l'utilità clinica delle CTC, al di là della ricerca, al fine di poter giungere all'utilizzo di dati provenienti dalle CTC per un trattamento individualizzato del paziente oncologico, caratterizzandone aspetti quali la predittività di risposta a un particolare trattamento o l'identificazione precoce della progressione di malattia e di meccanismi di resistenza.

## BIBLIOGRAFIA

1. Chemi F, Mohan S, Guevara T, Clipson A, Rothwell DG, Dive C. Early Dissemination of Chemi F, Mohan S, Guevara T, Clipson A, Rothwell DG, Dive C. Early Dissemination of Circulating Tumor Cells: Biological and Clinical Insights. *Front Oncol*. 2021 May 7;11:672195.
2. Weiss L. Metastasis of Cancer: A Conceptual History From Antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev* (2000) 19(3-4):193–383. 10.1023/A:1010623111204
3. Wittekind C, Neid M. Cancer Invasion and Metastasis. *Oncology* (2005) 1:14–6.
4. Vasseur A, Kiavue N, Bidard FC, Pierga JY, Cabel L. Clinical Utility of Circulating Tumor Cells: An Update. *Mol Oncol* (2020).
5. Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, Selva E, Vignaud J-M, Padovani B, et al. . “Sentinel” Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One* (2014) 9(10):e111597.
6. Ried K, Eng P, Sali A. Screening for Circulating Tumour Cells Allows Early Detection of Cancer and Monitoring of Treatment Effectiveness: An Observational Study. *Asian Pac J Cancer Prev* (2017) 18(8):2275–85. 10.22034/apjcp.2017.18.8.2275
7. Pantel K, Speicher MR. The Biology of Circulating Tumor Cells. *Oncogene* (2016) 35(10):1216–24.
8. Craene BD, Berx G. Regulatory Networks Defining EMT During Cancer Initiation and Progression. *Nat Rev Cancer* (2013) 13(2):97–110.
9. Keller L & Pantel K (2019) Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 19, 553–567.
10. Marusyk A, Almendro V & Polyak K (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12, 323–334.
11. Zeinali M, Lee M, Nadhan A, Mathur A, Hedman C, Lin E, Harouaka R, Wicha MS, Zhao L, Palanisamy N *et al.* (2020) High-throughput label-free isolation of heterogeneous circulating tumor cells and CTC clusters from non-small-cell lung cancer patients. *Cancers (Basel)* 12, 1.
12. Paoletti C, Larios JM, Muniz MC, Aung K, Cannell EM, Darga EP, Kidwell KM, Thomas DG, Tokudome N, Brown ME *et al.* (2016) Heterogeneous estrogen receptor expression in circulating tumor cells suggests diverse mechanisms of fulvestrant resistance. *Mol Oncol* 10, 1078–1085.
13. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour Heterogeneity in the Clinic. *Nature* (2013) 501(7467):355–64. 10.1038/nature12627

14. Polzer B, et al. EMBO Molecular Medicine, Volume 6, Issue 11, pages 1371–1386, November 2014 Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention
15. Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res.* 2013 Nov 1;73(21):6384–8. Review
16. Green BJ, Saberi Safaei T, Mephram A, Labib M, Mohamadi RM & Kelley SO (2016) Beyond the capture of circulating tumor cells: next-generation devices and materials. *Angew Chem Int Ed Engl* 55, 1252–1265.
17. Heitzer E, Auer M, Gasch C, Pichler M, Ulz P, Hoffmann EM, Lax S, Waldispuehl-Geigl J, Mauermann O, Lackner C *et al.* (2013) Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res* 73, 2965–2975.
18. Basik M, Aguilar-Mahecha A, Rousseau C, Diaz Z, Tejpar S, Spatz A, Greenwood CM & Batist G (2013) Biopsies: next-generation biospecimens for tailoring therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 10, 437–450.
19. Medoro G, et al. ADAPT 2011 Poster – “RNA Analysis of Pure Tumor Cells Sorted by DEPArray™ Platform from Enriched Blood Samples.”
20. Peeters DJE, et al. AACR 2012 Poster (Abstract # 4072) – “Molecular characterization of single tumor cells isolated from blood samples using immunomagnetic enrichment and dielectrophoretic cell sorting: a feasibility study.”
21. Polzer BM, et al. ACTC 2012 Oral Presentation – “Whole genome screen of single circulating tumor cells using a semiautomated workflow.”
22. Buson G. et al, Poster ACTC Crete 2014, “Simultaneous, targeted copy number variation (CNV) and single nucleotide variant (SNV) detection on single CTCs with Ampli1™ Whole Genome Amplification and Ion Torrent® AmpliSeq™ Custom Panel.”
23. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;**68**:4971–4976.
24. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;**448**:561–566.
25. Shaw AT, Solomon B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;**17**(8):2081–2086.

26. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010;**363**:1693–1703.
27. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, Kondo KL, Linderman DJ, Heasley LE, Franklin WA. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;**18**:1472–1482.
28. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, Dagogo-Jack I, Gadgeel S, Schultz K, Singh M. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov*. 2016;**6**:1118–1133.
29. Lin JJ, Riely GJ, Shaw AT. Targeting ALK: precision medicine takes on drug resistance. *Cancer Discov*. 2017;**7**:137–155.
30. McNeil CM, Sergio CM, Anderson LR, Inman CK, Eggleton SA, Murphy NC, Millar EK, Crea P, Kench JG, Alles MC. c-Myc overexpression and endocrine resistance in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;**102**:147–155.
31. Bonelli MA, Digiacomo G, Fumarola C, Alfieri R, Quaini F, Falco A, Madeddu D, La Monica S, Cretella D, Ravelli A. Combined inhibition of CDK4/6 and PI3K/AKT/mTOR pathways induces a synergistic anti-tumor effect in malignant pleural mesothelioma cells. *Neoplasia*. 2017;**19**(8):637–648.
32. Cretella D, Ravelli A, Fumarola C, La Monica S, Digiacomo G, Cavazzoni A, Alfieri R, Biondi A, Generali D, Bonelli M. The anti-tumor efficacy of CDK4/6 inhibition is enhanced by the combination with PI3K/AKT/mTOR inhibitors through impairment of glucose metabolism in TNBC cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;**37**(1):72.
33. De Luca, Antonella et al. “FGFR Fusions in Cancer: From Diagnostic Approaches to Therapeutic Intervention.” *International journal of molecular sciences* vol. 21,18 6856. 18 Sep. 2020
34. Babina I.S., Turner N.C. Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2017;**17**:318–332.
35. Goetz R., Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2013;**14**:166–180.

36. Senda T, Shimomura A, Iizuka-Kogo A. Adenomatous Polyposis Coli (Apc) Tumor Suppressor Gene as a Multifunctional Gene. *Anat Sci Int* (2005) 80(3):121–31.
37. Potter JD. Colorectal Cancer: Molecules and Populations. *JNCI J Natl Cancer Inst* (1999) 91(11):916–32.
38. Goss KH, Groden J. Biology of the Adenomatous Polyposis Coli Tumor Suppressor. *J Clin Oncol* (2000) 18(9):1967–79. 10.1200/JCO.2000.18.9.1967
39. Zhu L, Li X, Yuan Y, Dong C, Yang M. APC Promoter Methylation in Gastrointestinal Cancer. *Front Oncol*. 2021 Apr 23;11:653222.
40. Kumar-Sinha C & Chinnaiyan AM (2018) Precision oncology in the age of integrative genomics. *Nat Biotechnol* 36, 46–60.
41. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, Sander C & Stuart JM (2013) The cancer genome atlas Pan-cancer analysis project. *Nat Genet* 45, 1113–1120.
42. Scott AM, Wolchok JD & Old LJ (2012) Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 278–287.
43. La Thangue NB & Kerr DJ (2011) Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 587–596.
44. Basik M, Aguilar-Mahecha A, Rousseau C, Diaz Z, Tejpar S, Spatz A, Greenwood CM & Batist G (2013) Biopsies: next-generation biospecimens for tailoring therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 10, 437–450.
45. Keller L & Pantel K (2019) Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 19, 553–567.
46. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R & Rosenfeld N (2017) Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 17, 223–238.
47. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES & Speicher MR (2019) Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 20, 71–88.
48. Siravegna G, Marsoni S, Siena S & Bardelli A (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 531–548.
49. Labib M & Kelley SO (2020) Single-cell analysis targeting the proteome. *Nat Rev Chem* 4, 143–158.



50. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB & Johnston PG (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13, 714–726.
51. Marusyk A, Almendro V & Polyak K (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12, 323–334.
52. Brown R, Curry E, Magnani L, Wilhelm-Benartzi CS & Borley J (2014) Poised epigenetic states and acquired drug resistance in cancer. *Nat Rev Cancer* 14, 747–753.
53. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, Metcalf RL, Rothwell DG, Trapani F, Polanski R, Burt DJ, Simpson KL, Morris K *et al.* (2014) Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 20, 897–903.
54. Carter L, Rothwell DG, Mesquita B, Smowton C, Leong HS, Fernandez-Gutierrez F, Li Y, Burt DJ, Antonello J, Morrow C *et al.* (2017) Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer. *Nat Med* 23, 114–119.
55. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ & Raghavan D (2008) Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6302–6309.
56. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB Jr, Saad F *et al.* (2011) Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 364, 1995–2005.
57. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC *et al.* (2005) Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23, 1420–1430.
58. Hiltermann TJN, Pore MM, van den Berg A, Timens W, Boezen HM, Liesker JJW, Schouwink JH, Wijnands WJA, Kerner G, Kruijff FAE *et al.* (2012) Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor. *Ann Oncol* 23, 2937–2942.
59. Khoo BL, Greci G, Jing T, Lim YB, Lee SC, Thiery JP, Han J & Lim CT (2016) Liquid biopsy and therapeutic response: circulating tumor cell cultures for evaluation of anticancer treatment. *Sci Adv* 2, e1600274.
60. Foy V, Fernandez-Gutierrez F, Faivre-Finn C, Dive C & Blackhall F (2017) The clinical utility of circulating tumour cells in patients with small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 6, 409–417.
61. Lalmahomed, Z.S.; Kraan, J.; Gratama, J.W.; Mostert, B.; Sleijfer, S.; Verhoef, C. Circulating tumor cells and sample size: The more, the better. *J. Clin. Oncol.* 2010, 28, e288–e289.

62. Terai, M.; Mu, Z.; Eschelman, D.J.; Gonsalves, C.F.; Kageyama, K.; Chervoneva, I.; Orloff, M.; Weight, R.; Mastrangelo, M.J.; Cristofanilli, M.; et al. Arterial Blood, Rather Than Venous Blood, is a Better Source for Circulating Melanoma Cells. *EBioMedicine* 2015, 2, 1821–1826.